レーザスペckル法の植物水分ストレス検出への適用

石澤 広明*・松尾 司**・三木 誉史***

Vegetation Detection in Stress of Moisture Shortage Based on Laser Speckle Recognition

Hiroaki ISHIZAWA*, Tsukasa MATSUO** and Takashi MIKI***

This paper describes a new measuring method of plant vigor by using Laser speckle pattern. Furthermore, this proposes a practical application of this presented measurement system. The measuring instrument is consisted by a He-Ne Laser as the light source, and a set of optics, such as reflectors, a beam expander. The speckle pattern could be measured by a CCD camera through lenses. A Pothos (*Epipremnum aureum*) and Japanese morning glory (*Ipomoea nil*) were used as the sample plant. Their intact leaves were measured the speckle pattern images. Visible but small vigor veins could be clearly observed in the images obtained by the speckle patterns. On the other hand, withered ones have shown different images. The relationship has been obtained between the feature of the images and the chlorophyll degradation. It would be expected that the symptom of plant against some stress could be detected by measuring the Laser speckle pattern. It could be used as the sensor of the field server system at every field monitoring site.

Key Words: laser speckle, plant vigor, optimal measurement, non-invasive measurement, field monitoring

1. はじめに

食生活、ならびに農業生産・流通、さらにはこれらを取り巻く環境に関して、安全・安心システムが強く希求されている。このような社会ニーズに対応して、農業情報マルチメディアデータマイニングシステムの開発が大きく進捗し先端の情報システムが実用段階を迎えている¹⁾。このような動向に呼応し、X線、蛍光、可視画像、赤外線、あるいはテラヘルツ波などを用い、広帯域周波数における植物の応答を統合・駆使し、農業生産分野で有効に活用するオプティカルファーマーミングが構想され数多くの研究成果が得られている^{1)~5)}。農産物などの栽培プロセスにおける植物の生育状態は重要な生体情報といえ、迅速に計測するのみならず、植物体そのものに与える影響を可能な限り僅少にする配慮が必要

となる。オプティカルファーマーミング構想で用いられる計測手法は非破壊的手法であることから、最適な計測手法と考えられる。たとえば、波長 $3.3\mu\text{m}$ ~ $3.5\mu\text{m}$ や $7.7\mu\text{m}$ ~ $11\mu\text{m}$ の中赤外域における植物葉の吸収スペクトルは、植物の健全性に関する情報を与え、同一葉・同一部位の蛍光X線分析も可能になり総合的な生育状態計測にきわめて有効であるとの報告がなされている⁶⁾。一方、農産物の栽培では、作物の生長を常にモニタし、診断を加え、さらに障害などが生ずる可能性があれば適当な処置を講ずる必要がある。通常、栽培者は大きさや形状、色などの物理的情報を利用し、水や肥料を与え、あるいは農薬散布により栽培管理している。この際、問題となる植物の状態変化を早期に検出することが、適切な管理を実行する上で重要となる。

本研究では、水分ストレス下における植物の変化を簡便かつ非破壊で検出する計測システムとして、レーザスペckル法を提案する。植物葉のスペckルパターンの時間変化から、水分ストレスの影響を早期に発見できることを、実試料によるストレス負荷実験をもとに検討し⁶⁾、本手法の妥当性を明らかにした。

2. 計測原理

レーザ光で植物葉など生体を照射して得られるスペckルパターンは、バイオスペckルと呼ばれ⁷⁾、一般に粒状性を帯びた斑点模様となる。このスペckルパターンの時間変化は、生体内部の散乱粒子の流動や、生体を形成する組織の変

* 信州大学繊維学部 上田市常田 3-15-1

** ウシオ電機株式会社システムカンパニー 横浜市青葉区元石川町 6409

*** (財)日本繊維製品品質技術センタ 東京都中央区日本橋富沢町 7-19

* Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda

** USHIO Inc. System Company, 6409 Motoishikawa-cho, Aoba-ku, Yokohama

*** Japan Textile Products Quality and Technology Center, 7-19 Tomizawa-cho, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo (Received July 4, 2008)

(Revised December 16, 2008)

位,あるいは屈折率変化などが要因とされる^{7),8)}。植物が水分ストレスにさらされた場合,形態や色など物理的変化が顕著に現れない初期段階が観察される。その後,葉色に変化するとともにクロロフィル量の低下が観測され,やがて植物は枯死する。葉色やクロロフィル量の変化が現われる前に,植物体内では多様な生理反応が生じる。この結果,葉内では散乱粒子の流動が変化し⁷⁾,細胞形態や局所の屈折率変化が起きていると考えられる⁸⁾。このような反応は,一般に目視などでは観察できない。したがって,植物葉のバイオスペックルの時間変動を計測することにより,水分ストレスによる植物の変化を目視できる前段階で検出することが可能と考えられる。

3. 計測システムおよび実験方法

3.1 計測システム

本実験では,レーザスペックル計測システムを構築し用いた。Fig. 1 に計測システムの概略および外観を示す。また,Table 1 に計測システムの構成要素を示す。光源として He-

Fig. 1 Laser speckle pattern measuring system

Table 1 Laser speckle measuring system component

He-Ne laser	Model number	GLG-5360, NEC
	Wave length	632.8 nm
	Output	5 mW(continuous)
Beam Expander	Model number	BE-21-V, SIGMA KOKI
	Magnification	× 21.0
	Incident diameter	1.7 mm
	Wavelength range	510 to 700 nm
Video lens	Model number	55834-G, Edmund Optics
	Magnification	×10 - ×2.5
	Field of view	0.64 - 2.56 mm
	Working distance	35 mm
	Lens mount	C-mount
CCD camera	Model number	C5948-70, HAMAMATSU
	Sync system	EIA
	Scan type	2:1 interlace scan
	Lens mount	C-mount
	Pickup device	2/3" interline FOP-CCD
	Number of pixels	768(H) × 494(V)
	Cell size (H×V)	11.6 × 13.5 μm
	Effective number of pixels	752(H) × 485 (V)
	Resolution TV lines	570(H) × 485(V)
	Measurement area	8.723 × 6.548 mm
	Wavelength range	400nm to 1100nm

Ne レーザを使用した。レーザ光は,光軸調節のために設置した一對の全反射鏡を通過し,ピンホールを介して円形(外形 3 mm)に整形される。さらにビームエキスパンダで拡大平行化され(外形 30 mm),試料ホルダに固定した試料(植物葉)に照射される。なお,試料葉は切り取らず,生用のまま 2 枚の亚克力板で挟み固定し測定に供した。試料を透過した光はビデオレンズを装着した CCD カメラでスペックルパターンとして撮像され,画像はコンピュータに取り込まれ解析される。本実験では,計測時に干渉縞を生じない FOP (Fiber Optical Plane) 処理を施した CCD カメラ (HAMAMATSU C 5948-70, HAMAMATSU)を用いた。代表的な計測時のようすを Fig. 2 に示す。

3.2 実験方法

3.2.1 スペックルパターンの時間変動と植物生育活性

計測原理を検証する目的で,植物葉の正常部と異常部のスペックルパターンの時間変動を比較した。代表的な観葉植物のポトス (*Epipremnum aureum*) を試料に用いた。ポトスは育成の容易な観葉植物として普及しており,水ストレスなど各種ストレスに強い耐性をもつとされている。鉢植えのポトスの生葉のうち,部分的に退色して生育活性が低いと思われる部分,および葉色が濃緑色で生育活性が高いと考えられる部分を選択し,これらの部位のスペックルパターンを計測し比較した (Fig. 2 (a))。スペックルパターンの時間的変動を比較する際,1 秒あたり 10 枚の収録速度で 6 秒間観測し,60 フレームのスペックルパターンを得た。さらに,各画素の時間平均を算出し平均値画像を求めた。平均画像からの各画素の偏差分の絶対値を各フレーム分総計したものがこの時間間隔におけるスペックルパターンの変動の大きさを表わすものと考え⁹⁾,解析に用いた。本実験では,これを便宜上,積算画像と呼び試料部位の変動を表わす指標とした。また,レーザ光を使用せず白熱電球の照明下で同様の計測実験を行ない,レーザを光源とした場合と比較することにより本計測法の妥当性を考察した。

3.2.2 水分ストレス負荷

信州大学繊維学部キャンパス内(長野県上田市常田)において,アサガオ (*Ipomoea nil*) を鉢植えで慣行法により露地栽培し,2007 年 8 月に開花期を迎えたものを供試した。ちなみに,アサガオは環境汚染指標植物として指定されるなど,

Fig. 2 Speckle pattern measurement of the Pothos (*Epipremnum aureum*, left) and Japanese morning glory (*Ipomoea nil*) leaf

環境ストレスに敏感な反応を示す植物として知られている。水ストレス負荷として、開花期の試料に十分灌水したのち、灌水せず生育させる方法によった。水分ストレスを与えた時点から、先端葉のスペックルパターンを定期的に計測した (Fig. 2(b))。計測は、午前9時および午後5時の1日2回実施し、試料が枯死するまで継続した。6秒間・60フレームもスペックルパターンの計測と平行して、同一葉・同一部位のクロロフィル量を、光学濃度差測定方式葉緑素計(ミノルタ SPAD-502)を用い測定した。測定点は10点とし、SPAD値(任意単位)の平均値をクロロフィル量の代表値とした。

4. 実験結果および考察

4.1 活性部位識別

連続撮像 (Fig. 2(a)) したポトスの生葉において、葉色の濃い生育活性の高いと考えられる葉脈部 A、および退色して生育活性が低いと思われる葉脈部 B において、それぞれ任意の1画素を選び、時間的変化を求めた結果を Fig. 3 に示す。破線はそれぞれの画素の平均輝度である。活性のある部位では平均輝度値前後の変動が大きく、逆に活性の低い部位ではその変動が小さいことが判明した。これは、スペックルパターンの時間変動により生育活性の相違を識別できることを示唆している。すなわち、平均輝度と輝度値の変動(絶対値)を一定時間積算することで、そのサンプリング時点における植物の活性度を計測可能と考えられる。Fig. 4(a) および (b) に、本実験のポトス生葉のスペックルパターンの平均画像、および積算画像を示す。図の左上から右下に通って

Fig. 3 Brightness comparison of the speckle pattern at the active vein and the inactive vein of Pothos leaf

(a) mean speckle pattern (b) Integrated image

Fig. 4 Laser speckle pattern and its integrated image

いる黒い太線が太い葉脈であり、この葉脈の左下が茶色の枯死部、右上が緑色の正常部である。正常部では、水分移動などの活動があると考えられ、比較的細い葉脈が積算画像上で確認できる (Fig. 4(b))。一方、Fig 4(a)の平均画像においては対応する葉脈は明らかでない。また、枯死部では平均画像から葉脈が確認されるが (Fig. 4(a) 左下)、積算画像では明らかでない。枯死部においては、水分移動などが行なわれず、スペックルパターンとしては時間変動が小さいことに対応する。Fig. 5(a) および (b) に、白熱電球を光源として測定した同一試料同一部位の透過画像およびその積算画像を示す。積算画像は輝度値がほぼ零の様な画像となった (Fig. 5(b))。これは、インコヒーレント光を用いた撮像では、生葉中の生命活動に起因する変化を可視化できないことを示している。以上のことから、レーザスペックルパターンの時間変動を積算することにより、生育活性が高い領域を可視化して識別する可能性が得られ、本計測法の妥当性が検証できた。

4.2 水ストレスの検出

水分ストレスを負荷し始め、枯死するまでの9日間のアサガオ先端葉1枚のスペックルパターンを撮像して得た積算画像を Fig. 6 に示す。図はいずれも夕刻(17時)における画像の日変化を示している。1~4日目では比較的太い葉脈部のみならず細い葉脈部が確認された。5日目~7日目次第に細い葉脈部が不鮮明となり、積算画像全体の輝度が上昇した。さらに8日目、9日目では、積算画像全体が暗くなった。本実験における植物葉の可視画像を Fig. 6 にあわせて示す。外観において、1~4日目では顕著な変化は見られず、5日目以降で測定葉に軽微な変化が現われている。しかしながら、植物体全体としては、7日目午前時点ですべての葉の退色が確認された。その後、アサガオは顕著に萎れ、枯死状態まで急速に進行した。Fig. 7 にレーザスペックル法により算出した積算画像 (Fig. 6) の平均輝度値とクロロフィル値の日変化の対応関係を示す。図中の誤差棒は、測定点の標準偏差を示す。また、クロロフィル値は左縦軸に、積算画像の平均輝度値は右縦軸に対応している。クロロフィル値は6日目に急激に低下したのに対し、積算画像の平均輝度値は5日目に大きな変動を生じている。また、目視で葉の退色を確認したのは7日目の午前以降であった。このアサガオの変化は、

(a) transmission image (b) integrated image

Fig. 5 Corresponding transmission image of the white-light and its integrated image

Fig. 6 Daily variation of the integration image and typical appearance of Japanese morning glory leaf under moisture shortage. Number stands for the sampling day after moisture stress was applied. Each image was measured at 17:00 in the evening.

Fig. 7 Diurnal variation with chlorophyll contents (left vertical axis) and image average (right vertical axis)

水ストレスによって葉中の水分が減少し、そのため浸透圧が低下し、その結果細胞壁が破壊される過程を示すものと考えられる。また水ストレスによって、葉中で合成が促進される生長障害ホルモンであるアブシジン酸が、葉の浸透圧低下を促進するという植物生理学で得られている知見⁹⁾とよく対応している。本実験では、クロロフィル量は6日目以降に急激な減少を示している。一方、スペckルパターンから算出した積算画像の平均輝度値は、クロロフィルが急激に低下する時期より1日早い段階で観測されている (Fig. 7)。水分欠乏状態下のアサガオ葉内の浸透圧の低下に伴う物質移動の変化や細胞壁の分解による細胞形態の変化がこの時点で急激になったことが考えられる。これは、5日目以降に細い葉脈部が不鮮明となったこととも対応している。

以上のことから、本手法を用いることで、目視では確認できず、クロロフィル測定でも検知できない早期に、水ストレ

スに対応した植物の状態変化を検出できる可能性を得た。

本計測システムでは、レーザ光源として He-Ne レーザを用いている。一方、植物の光合成には赤色光が特に重要であること、気孔開閉や葉の形態形成には青色光の効果が大きいことなど、単色光が植物に与える影響によって光合成活性や生育状態が異なることが報告されている¹⁰⁾。スペckルパターンを観測するという本実験の範囲では、He-Ne レーザ光照射の植物への影響は、Fig. 3 で示すように顕著なものではなかった。これは、照射時間が6秒程度の短時間であり、レーザ光を拡大した結果、照射光の輝度が小さいことによるものと考えられる。しかしながら、レーザ光を連続照射してスペckルパターンを連続的に観測する場合には、光飽和現象が生じ、ストレス反応自体の検出感度を低下させることが考えられる。そのため、レーザ光を吸収のない帯域のもの、たとえば緑色のレーザ光源に変更する、さらに高速の画像記録方法などの検討が必要である。

5. ま と め

本論文では、レーザスペckル計測システムを構築し、その植物生育計測への適用について実験的検討を加えた。本論文のおもな結果は以下のとおりである。

(1) 本測定システムは、安定に連続発振する He-Ne レーザを光源として用い、マクロレンズを用いることによってスペckルパターンの拡大撮像が容易となり、1秒あたり10個の連続撮像が可能である。

(2) 活性のある緑色部分と、不活性である茶色部分を含むボトスの生葉を撮像葉とし、積算画像から活性部位識別を定性的に評価できる可能性を検証した。

(3) アサガオを用い、水分欠乏条件下での生葉のレーザスペckルを観測した。積算画像の平均輝度値変化を求めた結果、目視やクロロフィル測定で検出できない時点より早期に、水ストレスに対応した葉の活性変化を測定できる可能性を得た。

以上から、本計測法により、植物体内のストレス応答を早期に検出する可能性が拓かれた。水分欠乏ストレスに加えて、温度、日照量、病害、などに他のストレスに対する応答についての検証は今後の課題である。また、計測システムのレーザ光源の検討、画像処理の高速化、システムの小型化や非接触計測などの改善も今後重要な課題である。

なお、本研究は文部科学省グローバルCOEプログラムの助成を受けた。

参 考 文 献

- 1) 平藤, 亀岡: フィールドサーバによるマルチ・センサネットワークの開発, データベース・モデル協調システムの開発, 農林水産省農林水産技術会議事務局, 20/72 (2007)
- 2) 亀岡孝治: オプティカルファーマーミング, OPTRONICS, 5, 1/7 (2007)
- 3) SICE 2007 併設行事部門連携ポスターセッション資料, 計測自動制御学会部門協議会, 07PG0011 (2007)
- 4) SICE 2007 Work Shop Life Science and SICE Technologies, 計測自動制御学会部門協議会, 07PG0010 (2007)
- 5) N. Hayashi, A. Hashimoto, K. Suehara, M. Kanou, T. Kameoka, T. Kumon and K. Hosoi: X-Ray Fluorescent and Mid-Infrared Spectroscopic Measurements of Vigor Information of Tomato Plant, SICE Annual Conference 2007, 220/223 (2007)
- 6) T. Matsuo, H. Ishizawa, H. Hirabayashi, H. Kanai and T. Nishimatsu: Application of Laser Speckle Method to Water Flow Measurement in Plant Body, SICE-ICASE International Joint Conference, 3563/3566 (2006)
- 7) 門野博史: 統計的干渉法による植物を通じた環境計測, 応用物理, 73-6, 772/775 (2004)
- 8) R. A. Braga Jr., G. F. Rabelo, L. R. Granato, E. F. Santos, J. C. Machando, R. Arizaga and H. J. Rabal: Marcelo Trivi,

Detection of Fungi in Beans by Laser Biospeckle Technique, Biosystem Engineering, 91-4, 465/469 (2005)

- 9) たとえば, 増田芳雄: 植物の生理, 153/159, 岩波書店 (1986)
- 10) 長谷川, 安藤, 勝部, 前川: 生体電位による光照射に対する植物生理活動の評価, 自動制御連合講演会論文集, 864/867 (2007)

[著 者 紹 介]

石 澤 広 明 (正会員)

1980年東北大学大学院理学研究科物理学専攻修士。 (株)島津製作所, (社)長野県農工研を経て, 2002年信州大学繊維学部助教授, 2007年同准教授, 2008年同創造工学系准教授(改組), 現在に至る。レーザ計測, 赤外分光計測などの光応用計測に関する教育研究に従事。博士(工学)。化学工学会, 照明学会, 表面化学会, 繊維学会, 繊維機械学会, 日本文化財科学会などの会員。

松 尾 司

2008年信州大学工学系研究科繊維システム工学専攻修士。レーザスペckル計測システムの応用研究に従事。現在, ウシオ電機株式会社システムカンパニー開発部門光学プロセス課に在籍。

三 木 誉 史

2005年信州大学工学系研究科繊維システム工学専攻修士。レーザスペckル計測システムの研究に従事。現在, (財)日本繊維製品品質技術センタ中部事業所に在籍。